

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building 6th Floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0004
JAPON

Date of mailing (day/month/year) 01 August 2000 (01.08.00)	
Applicant's or agent's file reference B644MSOP1027	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/JP00/04348	International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 02 July 1999 (02.07.99)
Applicant AJINOMOTO CO.,INC. et al	

- The applicant is hereby notified of the date of receipt (except where the letters "NR" appear in the right-hand column) by the International Bureau of the priority document(s) relating to the earlier application(s) indicated below. Unless otherwise indicated by an asterisk appearing next to a date of receipt, or by the letters "NR", in the right-hand column, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- This updates and replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents.
- An asterisk(*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b). In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which was not received by the International Bureau or which the applicant did not request the receiving Office to prepare and transmit to the International Bureau, as provided by Rule 17.1(a) or (b), respectively. In such a case, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
02 July 1999 (02.07.99)	11/189512	JP	14 July 2000 (14.07.00)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. (41-22) 740.14.35

Authorized officer

Masashi HONDA

Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

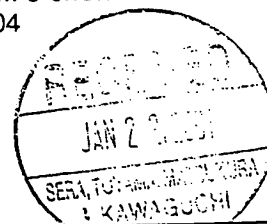
NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL APPLICATION TO THE DESIGNATED OFFICES

(PCT Rule 47.1(c), first sentence)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

TOYAMA, Tsutomu
Yokoyama Building 6th Floor
4-10, Higashi Nihonbashi 3-chome
Chuo-ku, Tokyo 103-0004
JAPON



Date of mailing (day/month/year) 11 January 2001 (11.01.01)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference B644MSOP1027			
International application No. PCT/JP00/04348	International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00)	Priority date (day/month/year) 02 July 1999 (02.07.99)	
Applicant AJINOMOTO CO.,INC. et al			

1. Notice is hereby given that the International Bureau has communicated, as provided in Article 20, the international application to the following designated Offices on the date indicated above as the date of mailing of this Notice:
AG,AU,BZ,DZ,KP,KR,MZ,US

In accordance with Rule 47.1(c), third sentence, those Offices will accept the present Notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

2. The following designated Offices have waived the requirement for such a communication at this time:
AE,AL,AM,AP,AT,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,CA,CH,CN,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,EA,EE,EP,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,NO,NZ,OA,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZW
The communication will be made to those Offices only upon their request. Furthermore, those Offices do not require the applicant to furnish a copy of the international application (Rule 49.1(a-bis)).

3. Enclosed with this Notice is a copy of the international application as published by the International Bureau on 11 January 2001 (11.01.01) under No. WO 01/02584

REMINDER REGARDING CHAPTER II (Article 31(2)(a) and Rule 54.2)

If the applicant wishes to postpone entry into the national phase until 30 months (or later in some Offices) from the priority date, a demand for international preliminary examination must be filed with the competent International Preliminary Examining Authority before the expiration of 19 months from the priority date.

It is the applicant's sole responsibility to monitor the 19-month time limit.

Note that only an applicant who is a national or resident of a PCT Contracting State which is bound by Chapter II has the right to file a demand for international preliminary examination.

REMINDER REGARDING ENTRY INTO THE NATIONAL PHASE (Article 22 or 39(1))

If the applicant wishes to proceed with the international application in the national phase, he must, within 20 months or 30 months, or later in some Offices, perform the acts referred to therein before each designated or elected Office.

For further important information on the time limits and acts to be performed for entering the national phase, see the Annex to Form PCT/IB/301 (Notification of Receipt of Record Copy) and Volume II of the PCT Applicant's Guide.

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer J. Zahra
Facsimile No. (41-22) 740.14.35	Telephone No. (41-22) 338.83.38

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner
 US Department of Commerce
 United States Patent and Trademark
 Office, PCT
 2011 South Clark Place Room
 CP2/5C24
 Arlington, VA 22202
 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
 in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 26 March 2001 (26.03.01)	
International application No. PCT/JP00/04348	Applicant's or agent's file reference B644MSOP1027
International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00)	Priority date (day/month/year) 02 July 1999 (02.07.99)
Applicant IZUI, Masako et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:02 February 2001 (02.02.01)☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:2. The election ☒ was☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04348

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12N 15/54, C12N 9/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁷ C12N 15/54, C12N 9/12

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE (STN), DDBJ/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP, 724017, A3 (AJINOMOTO CO INC), 17 September, 1997 (17.09.97) & JP, 8-196280, A	1-3
Y	US, 5556776, A (AJINOMOTO CO INC), 17 September, 1996 (17.09.96) & JP, 5-244958, A	1-3
Y	Gunasekaran P. et al., "Cloning and sequencing of the sacA gene: characterization (sucrase from Zymomonas mobilis)", J.Bacteriol. (1990), Vol.172, No.12, pp.6727-6735	1-3
Y	Reizer J. et al. "Novel phosphotransferase system revealed by bacterial genome analysis— a gene cluster encoding a unique Enzyme I and the proteins of a fructose-like permease system", Microbiology (1995), Vol.141, Pt.4, pp.961-971	1-3
Y	Wehmeier UF et al., "Molecular analysis of the phosphoenolpyruvate-dependent L-sorbose: phosphotransferase system from Klebsiella pneumoniae	1-3

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
11 September, 2000 (11.09.00)

Date of mailing of the international search report
19 September, 2000 (19.09.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04348

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	and of its multidomain structure", Mol.Gen.Genet. (1995) , Vol.246 , No.5 , pp.610-618	
Y	Steffen Tobisch et al., "Identification and characterization of a new β -glucoside utilization system in <i>Bacillus subtilis</i> ", Journal of Bacteriology (1997) , Vol.179, No.2, pp.496-506	1-3
A	Sato Y. et al., "Characterization and sequence analysis of the scrA gene encoding enzyme II Scr of the <i>Streptococcus mutans</i> phosphoenolpyruvate-dependent sucrose Phosphotransferas system", J.Bacteriol. (1989) Vol.171, No.1, pp.263-271	1-3
A	Wagner E. et al., "Cloning and characterization of the ScrA gene encoding the sucrose-specific Enzyme II of the phosphotransferase system from <i>Staphylococcus xylosus</i> ", Mol.Gen.Genet. (1993) , Vol.241, No.1-2, pp.33-41	1-3

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 B644MSOP1027	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/04348	国際出願日 (日.月.年) 30.06.00	優先日 (日.月.年) 02.07.99
出願人(氏名又は名称) 味の素株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☒ なし

☐ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/04348

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/54, C12N 9/12

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl¹ C12N 15/54, C12N 9/12

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

SwissProt/PIR/GeneSeq, MEDLINE(STN), DDBJ/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の
カテゴリー*

引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示

関連する
請求の範囲の番号

Y

EP, 724017, A3 (AJINOMOTO CO INC)
& JP, 8-196280, A

17.9月.1997 (17.09.97)

1-3

Y

US, 5556776, A (AJINOMOTO CO INC)
& JP, 5-244958, A

17.9月.1996 (17.09.96)

1-3

Y

Gunasekaran P. et al., "Cloning and sequencing of the sacA
gene: characterization (sucrase from Zymomonas mobilis)",
J. Bacteriol. (1990), Vol. 172, No. 12, p. 6727-6735

1-3

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.09.00

国際調査報告の発送日

19.09.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

齋藤 真由美

印

4N

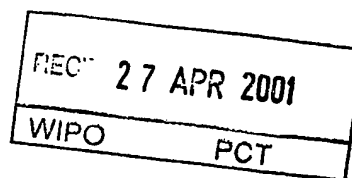
9839

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Reizer J. et al. "Novel phosphotransferase system revealed by bacterial genome analysis— a gene cluster encoding a unique Enzyme I and the proteins of a fructose-like permease system", Microbiology (1995), Vol.141, Pt.4, p.961-971	1-3
Y	Wehmeier UF et al., "Molecular analysis of the phosphoenolpyruvate-dependent L-sorbose: phosphotransferase system from Klebsiella pneumoniae and of its multidomain structure", Mol. Gen. Genet. (1995), Vol.246, No.5, p.610-618	1-3
Y	Steffen Tobisch et al., "Identification and characterization of a new β -glucoside utilization system in Bacillus subtilis", Journal of Bacteriology (1997), Vol.179, No.2, p.496-506	1-3
A	Sato Y. et al., "Characterization and sequence analysis of the scrA gene encoding enzyme II _{Scr} of the Streptococcus mutans phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase system", J. Bacteriol. (1989), Vol.171, No.1, p.263-271	1-3
A	Wagner E. et al., "Cloning and characterization of the scrA gene encoding the sucrose-specific Enzyme II of the phosphotransferase system from Staphylococcus xylosus", Mol. Gen. Genet. (1993), Vol.241, No.1-2, p.33-41	1-3

P C T

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)
(PCT36条及びPCT規則70)15^T

出願人又は代理人 の書類記号 B 6 4 4 M S O P 1 0 2 7	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知 (様式PCT/ I P E A / 4 1 6) を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P 0 0 / 0 4 3 4 8	国際出願日 (日.月.年) 3 0 . 0 6 . 0 0	優先日 (日.月.年) 0 2 . 0 7 . 9 9
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁷ C 1 2 N 1 5 / 5 4 , C 1 2 N 9 / 1 2		
出願人 (氏名又は名称) 味の素株式会社		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 3 ページからなる。

☐ この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)
この附属書類は、全部で ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

I ☒ 国際予備審査報告の基礎II ☐ 優先権III ☐ 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成IV ☐ 発明の単一性の欠如V ☒ PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明VI ☐ ある種の引用文献VII ☐ 国際出願の不備VIII ☐ 国際出願に対する意見

RECEIVED

MAY 23 2003

TECH CENTER 1600/2900

国際予備審査の請求書を受理した日 0 2 . 0 2 . 0 1	国際予備審査報告を作成した日 1 1 . 0 4 . 0 1	
名称及びあて先 日本国特許庁 (I P E A / J P) 郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 上 條 肇	4 N 9 8 3 9
電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8		

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条(PCT35条(2))に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性(N)	請求の範囲	1-3	有
	請求の範囲		無
進歩性(IS)	請求の範囲	1-3	有
	請求の範囲		無
産業上の利用可能性(IA)	請求の範囲	1-3	有
	請求の範囲		無

2. 文献及び説明(PCT規則70.7)

【請求項1-3】

請求項1-3に記載された発明は、国際調査報告で引用された文献1-8に対して進歩性を有する。文献1-8には、本願発明の“配列番号2”をコードするアミノ酸配列、“配列番号1に示す塩基配列のうち、塩基番号3778~5761からなる塩基配列”に相同性の高いものが記載されておらず、しかも該アミノ酸配列、塩基配列がシュークロース結合活性をもつ旨は、文献1-3から当業者といえども容易に想到しえないものである。



P.B.5818 - Patentlaan 2
2280 HV Rijswijk (ZH)
☎ +31 70 340 2040
TX 31651 epo nl
FAX +31 70 340 3016

Europäisches
Patentamt

Zweigstelle
in Den Haag
Recherchen-
abteilung

European
Patent Office

Branch at
The Hague
Search
division

Office européen
des brevets

Département à
La Haye
Division de la
recherche

Strehl Schübel-Hopf & Partner
Maximilianstrasse 54
80538 München
ALLEMAGNE

Erhalten
23. MAI 2003
Strehl et al.

RECEIVED

JUN 23 2003

TECH CENTER 1600/2900

Datum/Date

23.05.03

Zeichen/Ref./Réf.

EPA-53801

Anmeldung Nr./Application No./Demande n°/Patent Nr./Patent No./Brevet n°.

00940903.8-2405-JP0004348

Anmelder/Applicant/Demandeur/Patentinhaber/Proprietor/Titulaire

Ajinomoto Co., Inc.

COMMUNICATION

The European Patent Office herewith transmits as an enclosure the European search report for the above-mentioned European patent application.

If applicable, copies of the documents cited in the European search report are attached.

- ☐ Additional set(s) of copies of the documents cited in the European search report is (are) enclosed as well.

REFUND OF THE SEARCH FEE

If applicable under Article 10 Rules relating to fees, a separate communication from the Receiving Section on the refund of the search fee will be sent later.





European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 00 94 0903

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
E	EP 1 108 790 A (KYOWA HAKKO.KOGYO KK) 20 June 2001 (2001-06-20) SEQ ID 2904 shows 96,6% identity to SEQ ID 1, respectively 98,9% to SEQ ID 2. * abstract *	1-3	C12N15/54 C12N9/12
E	WO 01 02583 A (BASF AG) 11 January 2001 (2001-01-11) SEQ ID 1 shows 95,7% identity to SEQ ID 1 (1-1504:482-1983). * abstract *	1-3	
X	DATABASE EMBL 'Online! Pediococcus pentosaceus raffinose operon genes, 3 May 1994 (1994-05-03) retrieved from EBI Database accession no. L32093 XP002240257 * abstract *	1-3	
X	DATABASE EMBL 'Online! membran protein; sucrose transport protein, 13 October 1993 (1993-10-13) retrieved from EBI Database accession no. X69800 XP002240258 * abstract *	1-3	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7) C12N
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 8 May 2003	Examiner Mossier, B
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document		T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document	

2

EPO FORM 1503 03.82 (P04C04)



DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
Y	LEE J-K ET AL: "NUCLEOTIDE SEQUENCE OF THE GENE ENCODING THE CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM MANNOSE ENZYME II AND ANALYSES OF THE DEDUCED PROTEIN SEQUENCE" FEMS MICROBIOLOGY LETTERS, AMSTERDAM, NL, vol. 119, no. 1-2, 1994, pages 137-146, XP000960685 ISSN: 0378-1097 * abstract * * page 141, column 1, paragraph 3 - page 144, column 1, paragraph 3; figures 4,5 *	1-3	
Y	DOMINIQUEZ H ET AL: "COMPLETE SUCROSE METABOLISM REQUIRES FRUCTOSE PHOSPHOTRANSFERASE ACTIVITY IN CORYNEBACTERIUM GLUTAMICUM TO ENSURE PHOSPHORYLATION OF LIBERATED FRUCTOSE" APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 62, no. 10, October 1996 (1996-10), pages 3878-3880, XP000960659 ISSN: 0099-2240 * abstract * * page 3878, column 1, paragraph 1 - column 2, paragraph 3; table 1 * * page 3880, column 1 *	1-3	TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
A	KAWAHARA Y ET AL: "EFFECT OF GLYCINE BETAINE ON THE SUCROSE CATABOLISM OF AN L-LYSINE PRODUCING MUTANT OF BREVICBACTERIUM LACTOFERMENTUM" APPLIED MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER VERLAG, BERLIN, DE, vol. 34, no. 3, 1 December 1990 (1990-12-01), pages 340-343, XP000571746 ISSN: 0175-7598 * the whole document *	1-3	
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 8 May 2003	Examiner Mossier, B
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

2

EPO FORM 1503 03.82 (P04C04)



European Patent
Office

**SUPPLEMENTARY
EUROPEAN SEARCH REPORT**

Application Number
EP 00 94 0903

DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT			
Category	Citation of document with indication, where appropriate, of relevant passages	Relevant to claim	CLASSIFICATION OF THE APPLICATION (Int.Cl.7)
A	MARTIN J F ET AL: "CLONING SYSTEMS IN AMINO ACID-PRODUCING CORYNEBACTERIA" BIO/TECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING CO. NEW YORK, US, vol. 5, 1 February 1987 (1987-02-01), pages 137-146, XP002034056 ISSN: 0733-222X * the whole document * -----	1-3	
			TECHNICAL FIELDS SEARCHED (Int.Cl.7)
The supplementary search report has been based on the last set of claims valid and available at the start of the search.			
Place of search MUNICH		Date of completion of the search 8 May 2003	Examiner Mossier, B
CATEGORY OF CITED DOCUMENTS X : particularly relevant if taken alone Y : particularly relevant if combined with another document of the same category A : technological background O : non-written disclosure P : intermediate document T : theory or principle underlying the invention E : earlier patent document, but published on, or after the filing date D : document cited in the application L : document cited for other reasons & : member of the same patent family, corresponding document			

2

EPO FORM 1503 03.82 (P04C04)

**ANNEX TO THE EUROPEAN SEARCH REPORT
ON EUROPEAN PATENT APPLICATION NO.**

EP 00 94 0903

This annex lists the patent family members relating to the patent documents cited in the above-mentioned European search report. The members are as contained in the European Patent Office EDP file on
The European Patent Office is in no way liable for these particulars which are merely given for the purpose of information.

08-05-2003

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 1108790	A	20-06-2001	EP 1108790 A2	20-06-2001
			JP 2002191370 A	09-07-2002
			US 2002197605 A1	26-12-2002
<hr/>				
WO 0102583	A	11-01-2001	AU 5701400 A	22-01-2001
			BR 0012038 A	02-07-2002
			CA 2377378 A1	11-01-2001
			CA 2383865 A1	04-01-2001
			CA 2383875 A1	04-01-2001
			CN 1371420 T	25-09-2002
			CZ 20014700 A3	12-06-2002
			DE 1246922 T1	20-03-2003
			EP 1257649 A2	20-11-2002
			EP 1246922 A2	09-10-2002
			ES 2174768 T1	16-11-2002
			HU 0203191 A2	28-12-2002
			WO 0100843 A2	04-01-2001
			WO 0100844 A2	04-01-2001
			WO 0102583 A2	11-01-2001
			SK 18862001 A3	06-11-2002
			SK 18892001 A3	10-09-2002
			TR 200103706 T2	21-10-2002
			TR 200103854 T2	21-06-2002
<hr/>				

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/02584 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/54, 9/12
(21) 国際出願番号: PCT/JP00/04348
(22) 国際出願日: 2000年6月30日 (30.06.2000)
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語
(30) 優先権データ: 特願平11/189512 1999年7月2日 (02.07.1999) JP
(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.) [JP/JP]; 〒104-8315 東京都中央区京橋一丁目15番1号 Tokyo (JP).
(72) 発明者: および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 泉井正子 (IZUI, Masako) [JP/JP]. 杉本雅一 (SUGIMOTO, Masakazu) [JP/JP]. 中松 亘 (NAKAMATSU, Tsuyoshi) [JP/JP]. 倉 橋 修 (KURAHASHI, Osamu) [JP/JP]; 〒210-8681 神奈川県川崎市川崎区鈴木町1-1 味の素株式会社 発酵技術研究所内 Kanagawa (JP).
(74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒103-0004 東京都中央区東日本橋3丁目4番10号 ヨコヤマビル6階 Tokyo (JP).
(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, [続葉有])

(54) Title: DNA ENCODING SUCROSE PTS ENZYME II

(54) 発明の名称: シュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNA

(57) Abstract: A gene encoding a protein constituting sucrose PTS of a coryneform bacterium provided by amplifying the downstream domain of a coryneform bacterium sucrose gene by the cassette-ligation mediated PCR method and thus obtaining a DNA encoding sucrose PTS enzyme II which is the protein (A) or (B) described below: (A) a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 in Sequence Listing; and (B) a protein having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:2 in Sequence Listing by substitution, deletion, insertion, addition or inversion of one or more amino acids and having an activity of binding to sucrose.

(57) 要約:

コリネ型細菌のシュクラゼ遺伝子の下流領域をCassette-ligation mediated PCR法により増幅し、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質であるシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAを得ることにより、コリネ型細菌のシュークロースPTSを構成するタンパク質をコードする遺伝子を提供する。

(A) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

WO 01/02584 A1



LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

添付公開書類:

— 国際調査報告書

明細書

シュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNA

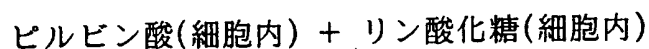
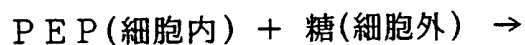
技術分野

本発明は、コリネ型細菌のシュークロースの細胞内への取り込みに関与するタンパク質であるシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAに関する。

背景技術

細菌は、多くの炭素源を資化することができるが、それらの細胞膜透過には種々の特異的な透過系が存在している。また、大抵の細菌は、限られた栄養下で生育するために環境の変化に応答することができる。環境をモニターして種々の炭素源の中から選択するために、細胞は検出器を備えている。このような、糖の透過系及び検出器として、PTS (phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system、又はphosphoenolpyruvate-sugar transport system) がある (以下、PTSについては、Escherichia coli and Salmonella Cellular and Molecular Biology, second edition, ASM (American Society for Microbiology) press 参照)。

PTSは、種々の糖 (PTS糖) の透過とリン酸化、これらの炭素源に向かう運動、及び多くの代謝経路の調節に関与している。PTSは、次の反応を触媒する。尚、PEPは、ホスホエノールビルビン酸を表す。



PTSは、細胞内のホスホエノールビルビン酸 (以下、「PEP」ともいう。) にリン酸基を細胞外の糖に転移してリン酸化糖とビルビン酸を生成する反応を触媒する。糖のリン酸化は、糖の細胞膜透過とリンクしており、これらのプロセスに必要なエネルギーは、解糖系の中間体であるPEPにより供給される。

エシェリヒア・コリ (*Escherichia coli*) 及びサルモネラ・チフィムリウム (*Salmonella typhimurium*) では、PTSを構成するタンパク質は、以下の反応を触媒する。

- (1) $PEP + EI \rightarrow P-EI + \text{ピルビン酸}$
- (2) $P-EI + Hpr \rightarrow P-Hpr + EI$
- (3) $P-Hpr + EIIA \rightarrow P-EIIA + Hpr$
- (4) $P-EIIA + EIIB \rightarrow P-EIIB + EIIA$
- (5) $P-EIIB + \text{糖 (細胞外)} + EIIB + \text{糖-P (細胞内)}$

上記反応にあずかるタンパク質のうち、EI (エンザイムI) 及びHpr (ヒスチジンタンパク質) は、すべてのPTS糖のリン酸化に関与する可溶性の細胞質タンパク質であり、普遍的PTSタンパク質 (general PTS protein) と呼ばれている。

一方、EII (エンザイムII) はPTS糖に特異的であり、糖によっていくつかのドメイン又はタンパク質からなっている。例えば、マンニトールではEIIはA、B及びCの3つのドメインからなる膜結合タンパク質であり、グルコースやシュクロースではEIIは膜結合タンパク質であるIIB及びIICと、可溶性タンパク質であるIIAからなる。いずれの場合でも、PEPから糖へのリン酸基の転移は、EI、Hpr、EIIA及びEIIBを介して行われる。EIIの膜内部分であるEII Cドメインは、転移チャネルを形成しており、おそらく基質の特異的結合部位であると考えられている。

EIIの第三のタイプは、マンノースPTSにみられるものであり、A、Bの両ドメインは単一の可溶性ポリペプチド中で融合しており、二つの膜内タンパク質 (IIC及びIID) がマンノースの透過に関与している。

エシェリヒア・コリ及びサルモネラ・チフィムリウムでは、EIをコードする遺伝子 (ptsI) はクローニング、配列決定がなされている (Saffen, E.W. et al., J. Biol. Chem., 262, 16241-16253 (1987)、De Reuse, H. and Danchin, A., J. Bacteriol., 170, 3827-3837 (1988))。また、EIIについても、いくつかの糖ではクローニングされている (Saffen, E.W. et al., J. Biol. Chem., 262, 16241-16253 (1987)、Erni, B. and Zanolari, B., J. Biol. Chem., 261,

16398-16403 (1986)、Nelson, S.O. et al., EMBO J., 3, 1587-1593 (1984))。

尚、糖の種類によっては、その細胞内への取込み系として、P E Pを必要としない非P T S (non-PTS) が存在するものも知られている。

発明の開示

上記のように、糖の細胞内への取り込みに関する研究が進んでいるが、産業上
有用なコリネ型細菌ではP T Sに関する研究は進んでいない。本発明は、コリネ
型細菌のシュークロースP T Sを構成するタンパク質をコードする遺伝子を提供
することを課題とする。

本出願人は、コリネ型細菌のシュクラゼ（インベルターゼ）をコードする遺
伝子を含むDNA断片を単離してその構造を決定し、さらに、増幅したシュクラ
ゼ遺伝子を保持するコリネ型細菌を用いたアミノ酸又は核酸の製造法を開発し
ている（特開平5-244958号、特開平8-196280号）。前記DNA断片のうち、約6k
bのSmaI断片及びそれに含まれるシュクラゼ遺伝子上流約1 kbの領域には、4
つのオープン・リーディング・フレーム（ORF-F1、ORF-F2、ORF-F3及びORF-F4）
が存在している。そのうち、ORF-F2がシュクラゼをコードしていると推定され
ている。

しかし、本発明者らは、他のシュクラゼ遺伝子との比較から、前記ORF-F2は
シュクラゼ遺伝子全長を含んでいないのではないかと考えた。すなわち、既知
のシュクラゼ遺伝子から推定されるシュクラゼのアミノ酸残基数は466～
511である（Gunasekren, P., J. Bacteriol. 172(12) 6727-35(1990)）のに
対し、ORF-F2がコードし得るアミノ酸配列は424アミノ酸残基と比較的短かっ
た。そこで、ORF-F2の下流の配列を再クローニングし、その塩基配列を決定した。
そして、前記のシュクラゼ遺伝子を含むDNA断片は、2つの独立したクロー
ン化断片が連結されたものであったことが明らかとなり、新たにシュクラゼ遺
伝子の下流にシュークロースP T SエンザイムIIをコードする遺伝子が存在する
ことを見出し、本発明に至った。

すなわち本発明は、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質である。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

本発明はまた、下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA を提供する。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

前記 DNA としては、下記 (a) 又は (b) に示す DNA が挙げられる。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列のうち、塩基番号 3 7 7 9 ~ 5 7 6 1 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列のうち、塩基番号 3 7 7 9 ~ 5 7 6 1 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

図面の簡単な説明

図 1 は、シュークロースPTSエンザイムII遺伝子破壊用プラスミドの構築過程を示す図。

図 2 は、pBCT4の構築過程を示す図。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明のDNAは、後記実施例においては、ブレビバクテリウム・ラクトファーマメントムの染色体DNAのシュクラーゼ遺伝子の下流領域をPCR（ポリメラ

ーゼ・チェイン・リアクション) によって増幅することによって取得されたものである。

染色体DNA上の既知の領域に隣接する領域は、その領域を含むDNAフラグメントにカセットを連結し、既知の領域に対応するプライマーと、カセットに対応するプライマーを用いたPCRによって増幅することができる。その際、カセットの5'末端を脱リン酸化しておく、と、染色体DNAフラグメントとカセットの5'末端との接続部位にはニックが生じる。そのため、カセットプライマーから始まるDNA合成はこの接続部位で停止し、合成プライマーから合成されたDNAのみがカセットプライマーからの合成の鋳型となり、相補鎖が形成される。その結果、特異的な増幅が可能となる(Cassette-ligation mediated PCR法(Molecular and Cellular Probes, 6, 467-475))。この方法を利用したキットが市販されており(宝酒造(株)製TAKARA LA PCRTM in vitro Cloning Kit)、本発明のDNAの取得に利用することができる。

本発明のDNAは、本発明のDNA及びその隣接領域の塩基配列が明らかとなったので、同塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプライマーに用いて、コリネ型細菌染色体DNAを鋳型とするPCRによって、直接増幅することができる。そのようなプライマーとしては、配列番号10及び配列番号21に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドが挙げられる。また、本発明のDNAは、その塩基配列に基づいて合成したオリゴヌクレオチドをプローブに用いるハイブリダイゼーションにより、染色体DNAライブラリーから単離することもできる。コリネ型細菌の染色体DNAは、例えばSaitoらの方法(Biochim. Biophys. Acta, 72, 619-629 (1963)に記載)あるいはK. S. Kirbyの方法(Biochem. J., 64, 405, (1956))等の方法により取得することができる。

その他、染色体DNAの調製、染色体DNAライブラリーの作製、ハイブリダイゼーション、PCR、プラスミドDNAの調製、DNAの切断及び連結、形質転換、プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの設定等の方法は、当業者によく知られている通常の方法を採用することができる。これらの方法は、Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)等に

記載されている。

本発明のDNAのクローニングや染色体DNAライブラリーの作製等に使用されるプラスミドとしては、エシェリア属細菌等の微生物において複製可能なものであればよく、具体的には、pBR322、pTWV228、pMW119、pUC19等が挙げられる。

上記のようにして取得される本発明のDNAを含むDNA断片の塩基配列の一例を、配列表の配列番号1に示す。同塩基配列中、塩基番号3779～5761からなる領域が、本発明のタンパク質であるシュークロースPTSエンザイムIIをコードしている。尚、配列番号1に示す塩基配列中、塩基番号342～1505、及び塩基番号2338～3609が、特開平8-196280号に記載のシュクラゼ遺伝子を含むDNA断片中のORF-F1、ORF-F2に各々相当する。また、配列番号1に示す塩基配列と、特開平8-196280号に記載の塩基配列とを比較すると、配列番号1に示す塩基配列において塩基番号1～3687の領域が、特開平8-196280号に記載の塩基配列と一致した。このことから、前記シュクラゼ遺伝子を含むDNA断片は、2つの独立したクローン化断片からなることが明らかとなった。

本発明のDNAは、コードされるシュークロースPTSエンザイムIIのシュークロースに結合する活性が損なわれない限り、1若しくは複数の位置での1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むシュークロースPTSエンザイムIIをコードするものであってもよい。ここで、「複数」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なる。それは、イソロイシンとバリンのように、アミノ酸によっては、類縁性の高いアミノ酸が存在し、そのようなアミノ酸の違いが、蛋白質の立体構造に大きな影響を与えないことに由来する。従って、シュークロースPTSエンザイムIIを構成するアミノ酸配列全体に対し、70～80%以上、好ましくは90～95%以上の相同性を有し、シュークロースに結合する活性を有するものであってもよい。具体的には、前記「複数」は、2～180個、好ましくは、2～60個、より好ましくは2～5個である。

上記のようなシュークロースPTSエンザイムIIと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAは、例えば部位特異的変異法によって、特定の部位のアミノ

酸残基が置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むように塩基配列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている変異処理によっても取得され得る。変異処理としては、シュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及びシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAを保持する微生物、例えばエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常変異処理に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位等には、シュークロースPTSエンザイムIIを保持する微生物の個体差、種や属の違いに基づく場合などの天然に生じる変異 (mutant又はvariant) も含まれる。

変異を有するシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAまたはこれを保持する細胞から、例えば配列表の配列番号1に記載の塩基配列のうち、塩基番号3779~5761からなる塩基配列を有するDNA又は同塩基配列を有するDNAからPCR法等により調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、シュークロースに結合する活性を有するシュークロースPTSエンザイムIIを有するタンパク質をコードするDNAを単離することによって、シュークロースPTSエンザイムIIと実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げられる。ここで相同性は、Lipman-Pearsonの方法(Science 227, 1435-1441 (1985))又はTakashi & Gotohの方法(J. Biochem. 92, 1173-1177 (1984))により算出される値である。プローブの設計は、当業者に公知の方法に従って行うことができる。

このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコドンが発生したものも含まれるが、それらについては、市販の発現ベクターにつなぎ発現産物の大きさを調べることによって、容易に取り除くことができる。

本発明のタンパク質は、上記本発明のDNAによってコードされるタンパク質であり、配列番号2に示すアミノ酸配列を有する。本発明のタンパク質は、シュークロースに結合する活性を有する限り、配列表の配列番号2に記載のアミノ酸配列において、1若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有するものであってよい。

本発明のDNAは、コリネ型細菌のシュークロース取り込み能の改善等に利用することができる。また、PTSは、糖の細胞内への取り込みにPEPを消費するため、生合成系の上流にPEPが位置するアミノ酸等の合成にとっては不利であると考えられる。そこで、シュークロースPTSを破壊し、PEPを必要としない取り込み系によりシュークロースを取り込むことができれば、シュークロースの取り込み速度やアミノ酸等の生産性の点からは有利であると考えられる。尚、コリネ型細菌では、シュークロースの非PTSは知られていないが、例えばシュクラゼを細胞外に作用させれば、グルコース及びフルクトースを非PTSで取り込むことができる。

また、本発明のDNAを改変し、機能が強化又は低減されたシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNA、又は他の遺伝子由来のプロモーター等の発現制御配列に連結した本発明のDNAを、コリネ型細菌に導入することによって、シュークロース取り込み能が強化又は低減されたコリネ型細菌を創製することができる。具体的には、機能が強化されたシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAは、コリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクター上又は染色体DNA上に保持される。また、機能が低減されたシュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNAは、相同組換えを利用した遺伝子置換によって染色体DNA上に保持される。あるいは、温度感受性複製制御領域を含むプラスミドを用いた遺伝子置換（特公平7-108228号参照）によって、低温ではシュークロースPTSが機能し、高温では機能しないコリネ型細菌を創製することもできる。

本発明を応用可能なコリネ型細菌は、従来ブレバクテリウム属に分類されていたが現在コリネバクテリウム属に統合された細菌を含み (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1981))、またコリネバクテリウム属と非常に近縁なブレバクテリウム属細菌を含む。このようなコリネ型細菌の例として以下のものが挙げられる。

コリネバクテリウム・アセトアシドフィラム

コリネバクテリウム・アセトグルタミカム

コリネバクテリウム・アルカノリティカム

コリネバクテリウム・カルナエ

コリネバクテリウム・グルタミカム

コリネバクテリウム・リリウム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

コリネバクテリウム・メラセコーラ

コリネバクテリウム・サーモアミノゲネス

コリネバクテリウム・ハーキュリス

ブレバクテリウム・ディバリカタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・フラバム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・インマリオフィラム

ブレバクテリウム・ラクトファーマメンタム (コリネバクテリウム・グルタミカム)

ブレバクテリウム・ロゼウム

ブレバクテリウム・サッカロリティカム

ブレバクテリウム・チオゲニタリス

ブレバクテリウム・アンモニアゲネス (コリネバクテリウム・アンモニアゲネス)

ブレバクテリウム・アルバム

ブレバクテリウム・セリヌム

ミクロバクテリウム・アンモニアフィラム

コリネ型細菌の細胞内において自律複製可能なベクターとしては、pAM330 (特開昭58-67699号公報参照)、pHM1519 (特開昭58-77895号公報参照) 等が挙げられ

る。また、これらのベクターからコリネ型細菌中でプラスミドを自律複製可能にする能力を持つDNA断片を取り出し、エシェリヒア・コリ用のベクターに挿入すると、エシェリヒア・コリ及びコリネ型細菌の両方で自律複製可能ないわゆるシャトルベクターとして使用することができる。このようなシャトルベクターとしては、以下のものが挙げられる。尚、それぞれのベクターを保持する微生物及び国際寄託機関の受託番号をカッコ内に示した。これらの内、pHSC4は温度感受性複製制御領域を含む。

pAJ655 エシェリヒア・コリアJ11882(FERM BP-136)

コリネバクテリウム・ゲルタミクムSR8201(ATCC39135)

pAJ1844 エシェリヒア・コリアJ11883(FERM BP-137)

コリネバクテリウム・ゲルタミクムSR8202(ATCC39136)

pAJ611 エシェリヒア・コリアJ11884(FERM BP-138)

pAJ3148 コリネバクテリウム・ゲルタミクムSR8203(ATCC39137)

pAJ440 バチルス・ズブチリスAJ11901(FERM BP-140)

pHC4 エシェリヒア・コリアJ12617(FERM BP-3532)

pHSC4 エシェリヒア・コリアJ12571(FERM BP-3524)

本発明のDNAを含む組換えベクターをコリネ型細菌に導入するには、これまでに報告されている形質転換法に従って行えばよい。例えば、エシェリヒア・コリ K-12について報告されているような、受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) があり、バチルス・ズブチリスについて報告されているような、増殖段階の細胞からコンピテントセルを調製してDNAを導入する方法 (Duncan, C.H., Wilson, G.A. and Young, F.E., Gene, 1, 153 (1977)) がある。あるいは、バチルス・ズブチリス、放線菌類及び酵母について知られているような、DNA受容菌の細胞を、組換えDNAを容易に取り込むプロトプラストまたはスフェロプラストの状態にして組換えDNAをDNA受容菌に導入する方法 (Chang, S. and Choen, S.N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M.J., Ward, J.M. and Hopwood, O.A., Nature, 274, 398 (1978); Hinnen, A., Hicks, J.B. and Fink, G.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75 1929 (1978))、及び電気パルス法 (特開平2-2

07791号公報参照)も応用できる。

実施例

以下、本発明を詳細に説明する。

実施例1 シュークロースPTSエンザイムIIをコードする遺伝子の単離

<1>ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036 (FERM BP-734) の染色体DNAのサザンハイブリダイゼーションによる解析

ブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036を、M-CM2S培地(シュークロース5g/L、ポリペプトン10g/L、酵母エキス(Yeast Extract)10g/L、NaCl 5g/L、DL-メチオニン0.1g/L) 4ml中で一晩培養し、菌体を回収した。得られた菌体よりBacterial Geneomic DNA Purificationキット(Advanced Genetic Technologies Corp.社製)を用いて染色体DNAを抽出した。染色体DNAは、TE緩衝液(組成: 10mM トリス-HCl (pH7.5)、1mM EDTA-2Na) 50 μ lで溶出した。

上記のように抽出した染色体DNAについて、Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)に記載の方法に従い、サザンハイブリダイゼーションを行った。染色体DNAは、ORF-F2のC末端側とORF-F3のN末端側の領域を切断しないBamHI、SmaIで別々に消化し、アガロース電気泳動に供した。プローブとして、pSSM30(特開平8-196280号)上にクローニングした6.9kbのうちORF-F2のC末端側とORF-F3のN末端側の領域をカバーするようなBamHIで切り出される約3kbの断片(特開平8-196280、配列表の配列番号1649~4675のフラグメント)を用いた。

ハイブリダイゼーションの結果、バンドが2本検出され、ORF-F2とORF-F3は染色体上では隣接しないことが明らかとなった。そこで、シュクラーゼ遺伝子の下流の配列を再確認することとした。

<2>シュクラーゼ遺伝子の下流領域の配列の決定

シュクラーゼ遺伝子の下流の領域の塩基配列の決定については、まず、下流領域をPCR法により増幅した。PCRは、宝酒造(株)製TAKARA LA PCR TM in vitro C

loning Kitを用いて行った。具体的には以下のようにして行った。

染色体DNAを、前記キット付属のカセット（配列表配列番号3～8）と同じ切断末端を生じる制限酵素10種類（SpeI、EcoT14I、NheI、PstI、EcoT22I、BglII、BamHI、XhoI、SalI、AvaI）を用いて完全消化した。これらのフラグメントを鋳型として、表1に示す合成プライマー1と、カセットプライマー1（配列番号19）を用いてPCRを行った。カセットの5'末端にはリン酸基が付加されていないので、染色体DNAフラグメントとカセットの5'末端との接続部位にはニックが生じる。そのため、カセットプライマーから始まるDNA合成はこの接続部位で停止し、合成プライマーから合成されたDNAのみがカセットプライマーからの合成の鋳型となり、相補鎖が形成される。

次に上記で得られた増幅産物を鋳型として、合成プライマー2とカセットプライマー2（配列番号20）を用いてPCRを行った。その結果、鋳型として染色体DNAをEcoT14I、PstI、BglII、BamHI、XhoI、AvaIで切断したDNAを用いた場合に、フラグメントが増幅できた。BamHI消化したDNAフラグメントを鋳型として増幅された断片約1.8kbについて、塩基配列決定を行った。

表1 合成プライマーの塩基配列及びその位置

プライマー 番号	塩基配列	配列番号1における 位置(塩基番号)
1	CGTCTTGCAGGATTCAGCGAGCTG (配列番号9)	(3159~3183)
2	AGCTGGATTTCGGCCATGAATTCTA (配列番号10)	(3179~3203)
3	GATCTGTTCCGGTCCGCAATCACT (配列番号11)	(4189~4212)
4	CACTGGTGGAGATGTTCCCTCAGAT (配列番号12)	(4209~4233)
5	CATCTTCGCAACCGCATCCATGGCC (配列番号13)	(4801~4825)
6	CGCGCAGGGTGCAGCATGTTTGGC (配列番号14)	(4831~4854)
7	GGGCCTTGCAGGTGCTTCAGGTGTC (配列番号15)	(4888~4912)
8	CCGCTGTTCTTGGTATTACAGAGCC (配列番号16)	(4914~4938)
9	GCAGCGTCAGCGATGCCATGTTTGC (配列番号17)	(5322~5346)
10	GCTTGGCTCAGGTGTTGCGATCGTC (配列番号18)	(5356~5380)

決定した配列を基に、合成プライマー3と4を合成した。上記と同様にして、合成プライマー3とカセットプライマー1の組み合わせ、及び合成プライマー4とカセットプライマー2の組み合わせで、フラグメントを順次PCRにより増幅した。その結果、染色体DNAをPstIまたはBamHIで切断したDNAを鋳型にした場合に、フラグメントが増幅できた。PstI消化したDNA断片を基に増幅したフラグメントについて塩基配列の決定を行った。

決定した配列をもとに、合成プライマー5と6を合成した。合成プライマー5とカセットプライマー1、合成プライマー6とカセットプライマー2の組み合わせで、順次PCRを行ったところ、鋳型としてEcoT14消化染色体DNA及びPstI消化染色体DNAを用いた場合に、増幅断片が確認できた。前者について塩基配列決定を行った。

更に、合成プライマー7と8を合成し、上記と同様の操作を行ったところ、Ec

oT14消化染色体DNAを鋳型に用いたときに、増幅断片が確認できた。この増幅断片の塩基配列を決定した。

上記配列を基に、プライマー 9 と 10 を合成し、上記と同様の操作を行ったところ、SpeI消化染色体DNAを鋳型に用いたときに、増幅断片が確認できた。この増幅断片の塩基配列を決定した。

塩基配列の決定は、ABI社製のシーケンスキットを用いてプロトコールに従い反応させた後、蛍光標識法により増幅フラグメントの塩基配列を決定した。

以上の結果を、配列表の配列番号 1 に示す。同塩基配列中の塩基番号 3684 以降に、新規に ORF が存在することが判明した。ORF は塩基番号 3779 ~ 5761 の 1983bp からなり、決定した塩基配列を翻訳して得られる蛋白質は 661 アミノ酸であると推定された。同 ORF について GENBANK CDS データベースにより相同性検索を行った。その結果、表 2 に示すように、前記 ORF がコードし得るタンパク質は、シュークロースの取り込みに特異的な蛋白質であるシュークロース P T S エンザイム II と高い相同性を示した。以下、前記 ORF を ptsII_{suc} 遺伝子と呼ぶ。

表 2 新規 ORF の相同性検索の結果

細菌及び遺伝子名		相同性のある既知の蛋白質	相同性(%)
P. pentosaceus	scrA	EnzymeIIscr	48.8
B. subtilis	treP	trehalose-specific enzyme IIBC	43.4
S. xyloso	scrA	EnzymeIIscr	52.2
S. mutans	scrA	EnzymeIIscr	45.4
S. typhimurium			
plasmid pUR400	scrA	EnzymeIIscr	37.6

実施例 2 シュークロース P T S エンザイム II 遺伝子破壊株の作製

ptsIIIsuc遺伝子が破壊されたブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムを作製した。まず、遺伝子破壊用のプラスミドを構築した(図1)。まず、ブレバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036の染色体を鋳型に、前記プライマー2(配列番号10)及び以下に示す塩基配列を有するプライマー11(配列番号21)を用いてPCRで増幅したptsIIIsuc遺伝子断片を、TAクローニングキット(Invitrogen社製)を用いてクローニングし、同プラスミドをpCRS2とした。

(プライマー11)

CGCTACTGCTGAACGAACATGTCC (配列番号1の塩基番号5947~5924に相当)

pCRS2より、XbaI、SpeI消化により切り出した断片をpHSG399のXbaIサイトに接続し、p399S2を構築した。このプラスミドをHpaI、BamHI消化し、生じたフラグメント(配列番号1の塩基番号4385~4798に相当)を、SmaI、BamHI消化したpHSG299と連結し、プラスミドpdSBを構築した。次に、pdSBをBamHI消化し、プラスミドpBCT4をBamHI消化して切り出したコリネ型細菌で複製可能な温度感受性複製起点(特公平7-108228号参照)を接続し、プラスミドpdSBTを構築した。同プラスミドは、5'末端部及び3'末端部を欠失したptsIIIsuc遺伝子を含んでいる。pdSBTは、コリネ型細菌中で、約10~32℃では自律複製できるが、約34℃以上では自律複製できない。

尚、pBCT4は、次のようにして構築した。特公平7-108228号に記載の温度感受性ベクターpHSC4を制限酵素BamHI及びKpnIで切断し、得られた温度感受性複製起点を含む約3kbのDNA断片を得た。得られたDNA断片の両末端をT4 DNAポリメラーゼにより平滑末端化した。このDNA断片にBamHIリンカーを接続し、これを再びBamHIで切断した後、同じくBamHIにて切断したpHSG399と接続し、pBCT4を得た(図2)。

pdSBTでブレビバクテリウム・ラクトファーマンタムAJ12036を形質転換し、25 µg/mlのカナマイシンを含むCM2Sプレート上を用いて形質転換体を選択した。形質転換は、電気パルス法(特開平2-207791号参照)により行った。取得した形質転換体を、AJ12036/pTSBTと命名した。AJ12036/pTSBT株をカナマイシン25 µg/mlを含むM-CM2Sプレートに、プレートあたり10³~10⁵ cfu程度になるように希釈して塗布した。このプレートを34℃にて一晩培養した後、薬剤耐性を示す株を染色体にプラスミドが組み込まれた株として取得した。得られた株について、相同組

換えにより宿主染色体のpTSIIIsuc遺伝子の中にベクタープラスミドが組み込まれていることを、PCRにより確認した。この組み込み株をYdS1と命名した。

YdS1株について、糖源をグルコース又はシュークロースとする最少培地（グルコースまたはシュークロース20g/L、硫酸アンモニウム5g/L、尿素2g/L、KH₂PO₄ 1g/L、MgSO₄・7H₂O 0.5g/L、FeSO₄ 0.002g/dl、MnSO₄ 0.002g/dl、ビオチン100μg/L、ビタミンB₁ 2000μg/L、DL-メチオニン10mg/dl、寒天15g/L、pH6.6）にて34℃にて培養した。結果を表3に示す。YdS1株は、グルコースのみを炭素源とする最少培地では生育できるが、シュークロースのみを炭素源とする最少培地では生育不可能であったことから、ptsIIIsuc遺伝子は、シュークロース取り込みにおいてシュークロース特異的な蛋白であるエンザイムIIをコードする遺伝子であると確認された。

表3 最少培地上での生育

菌株	炭素源	
	シュークロース	グルコース
AJ12036	可	可
YdS1	不可	可

産業上の利用可能性

本発明により、コリネ型細菌のシュークロースPTSエンザイムIIをコードする遺伝子、及びシュークロースPTSが機能しないコリネ型細菌の菌株が提供される。これらの遺伝子及び菌株は、糖の取り込み速度やアミノ酸及び核酸等の生産性が向上した菌株の育種等に利用することができる。

請求の範囲

1. 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

2. 下記 (A) 又は (B) に示すタンパク質をコードする DNA。

(A) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号 2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質。

3. 下記 (a) 又は (b) に示す DNA である請求項 2 記載の DNA。

(a) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列のうち、塩基番号 3 7 7 9 ~ 5 7 6 1 からなる塩基配列を含む DNA。

(b) 配列表の配列番号 1 に示す塩基配列のうち、塩基番号 3 7 7 9 ~ 5 7 6 1 からなる塩基配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、シュークロースに結合する活性を有するタンパク質をコードする DNA。

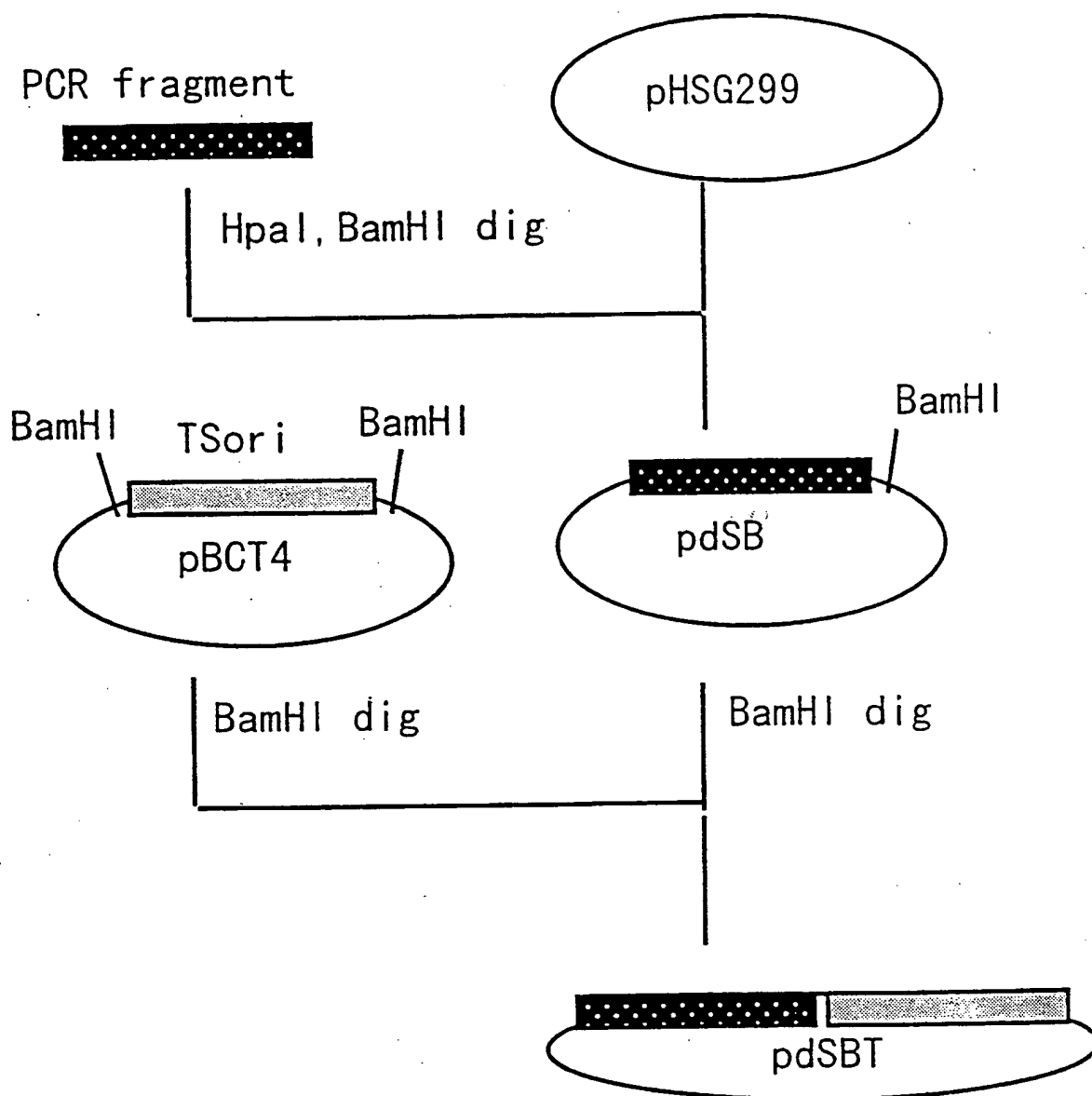


FIG.1

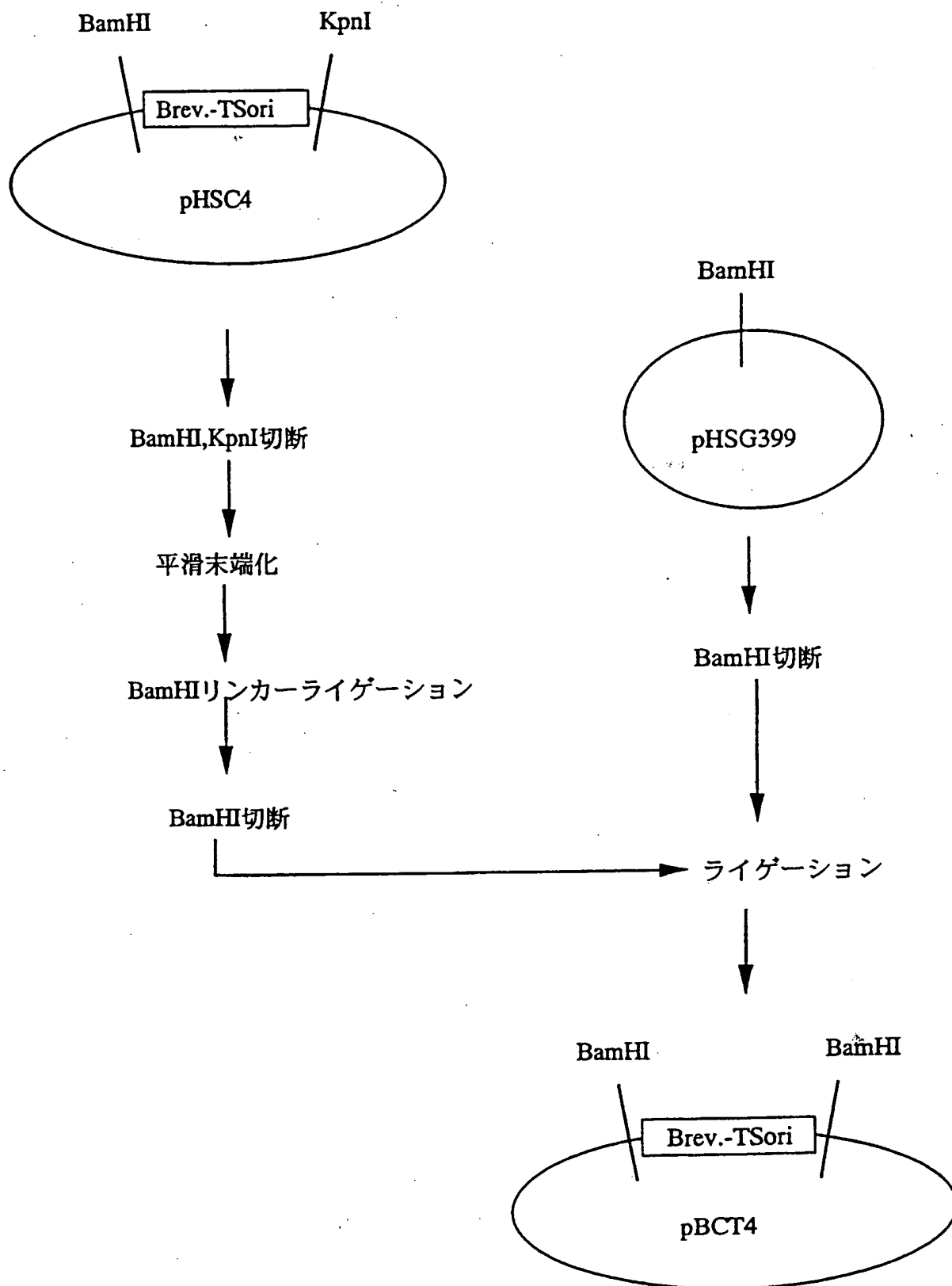


FIG.2

SEQUENCE LISTING

<110> Ajinomoto Co., Inc. (味の素株式会社)

<120> シュークロースPTSエンザイムIIをコードするDNA

<130> B644MSOP1027

<150> JP 11-189512

<151> 1999-07-02

<160> 21

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 5969

<212> DNA

<213> Brevibacterium lactofermentum

<220>

<221> CDS

<222> (3779)..(5761)

<400> 1

agtcggtcga cgccaccatt gatgtggtgg tcaccgagct tgcggaggct ttctacatct 60
acgtcccgt cggcgtggag tggggtcatt acgggtggga tcacgccggt gaaagttgcg 120
gaacccatgg tgttccttgt gggttgaggg aacgagtgcg ggtgagaagt ttttcaagtg 180
tctgcagttt ttaagttatg catcatcage ttggaaggct gaggtaatc agtagacctg 240

caacagcagg cctcaagtc gaagataatt aacctagatc cgtagacata agacatcata 300
cgtectatgc ttgctggaag gaaccaaata acctcagaaa gatggcagaa gtggtgcatt 360
atcaagaaaa tgcaggtcaa gcagttaaaa aaattgaggg aagaattgtt cccccctcg 420
gggtgattga tggttttctc caactcgaac acggcatcat cacggaactc tctggagaac 480
cagcacctaa aaacgcagga ttccaccccg aactccccac gattgttccc ggttttattg 540
atcttcataa tcacggtgga aacggtggcg cgtttcctac gggaacgcag gaccaggcga 600
ggaacaccgc gcagtatcac cgcgaacatg gcacgaccgt gatgttgcca agcatggttt 660
cggegcgcgc tgacgcactg gcagcgcagg tggaaaacct tattcccttg tgtgaagagg 720
tctgtctgtg cggcattcac ctcgagggcc ctttcacaa cgcattgccg tgtggtgctc 780
aaaacccgga ttctattttt cccggcaacc caacagatct tgcccgggtg atccatgcgg 840
gaaaagggtg gatcaaatcg atcacagtag cgccggaaac tgacaatctt tctgagcttc 900
tcgatctctg cgcagcgcac cacatcattg cttccttcgg gcacactgat gcagattttg 960
ataccactac cagcgcatt gccttggtc aagagaaaaa tgtgacggtc acggctacgc 1020
atttgttcaa tgcgatgcct ccgtgcac atagggtcc cggcagcgtg ggcgtttgc 1080
ttgtgcggc acgtgccggg gacgcataat ttgagttgat cgccgacggc gtgcatttg 1140
ccgatggaac ggtcgatcta gtcgttcca acaacgcctt ttcatcacg gacgccatgg 1200
aagccgcccg aatgccagac ggtgagtaca ttttggcgt tttgaacgc accgtcacgc 1260
atggagtcgc ccgtctgcgc gatggcggcg ccatcgccg gggcaccagc aactagcga 1320
gtcagttcgt gcaccacgtg cgcaggggta tgacgttat cgacgcgacc ctccacacct 1380
caaccgtgc cgtataaatt ctcggtcttg gcgatacga aatcgctaaa tccaacctg 1440
caaattttgt ggtctttgac tcaaacggcc aggtgcaaaa ggtccattta ggtcatcaag 1500
tactttaagt acgagtaaaa ctatctgat tttaaaggag tcccaccatg gaaatcata 1560
tctgcaaaga cgagcaagaa gtcggcaaag cagttgcagt cctaategca ccttcgcca 1620
acaagggtgg aaccttgggg cttgcaacag gatcctcacc actgagtacc taccaagagc 1680
tcattcgcat gtatgaagct ggggaagtgt cattcaagaa ctgcaaggca ttcttgttg 1740
atgaatacgt gggactaacc cgtgacgatg aaaacagcta ctttaaaacc attcgcaaag 1800
agttcactga ccacatcgac atcgttgatg aagaggtcta cagcccagat ggtgcaaacc 1860
ctgatccata cgaagcagct gcagagtatg aggcaaagat cgctgcagaa tccgttgaag 1920
ttcaaatect tggcatcggc ggaaacggca categtttc attgaacct catcttctct 1980

gtcaggactg acaaaggtcc aggcgctgca cctaaaaact gtggaggaca acgctcgatt 2040
cttcaacacc atcgaagagg tcccaaccca cgccgtcacc cagggtttgg gcactttgtc 2100
ccgcgcgcaa aacatcgtgt tgggtggcaac tggatgaagga aaagccgacg ccacccgcgg 2160
aactgtggaa ggcccagtga ctgcttcttg cccaggttcc atcctgtaga tgcacaacat 2220
gccaccatca tegttagatg aagcagcagt atccaagctg gaaaacgctg atcactaccg 2280
tctcatggag caattaaagc tgcgctagaa aaaaaagga aagtactgtg tggggctatg 2340
cacacagaac ttccagttt gcgccctgcg taccatgtga ctctccgca gggcaggctc 2400
aatgatecca acggaatgta cgtcgatgga gataccctcc acgtctacta ccagcacgat 2460
ccaggtttcc ctttcgcacc aaagcgcacc ggctgggctc acaccaccac gccgttgacc 2520
ggaccgcagc gattgcagtg gacgcacctg cccgacgctc ttaccgcgga tgcatactat 2580
gacctggatg gatgctattc cgggtggagcc gtatttactg acggcacact taaacttttc 2640
tacaccggca acctaaaaat tgacggaaaag cgccgcgcca cccaaaacct tgcgaagtc 2700
gaggacccaa ctgggctgat gggcggcatt catcgccgtt cgcctaaaaa tccgcttate 2760
gacggaccgg ccagcggttt cacaccccat taccgcgac ccatacagc cctgatgggt 2820
gatggttggga acatggttct tggggcccaa cgcgaaaacc tcaccggtgc agcggttcta 2880
taccgctcga cagatcttga aaactgggaa ttctccggtg aaatcacctt tgacctcagt 2940
gatgcacaac ctggttctgc tctgatctc gttcccgatg gctacatgtg ggaatgcccc 3000
aaccttttta cgcttcgca tgaagaaact ggcaagatc tcgacgtgt gattttctgt 3060
ccacaaggat tggaccgaat ccacgatgag gttactcact acgcaagctc tgaccagtgc 3120
ggatatgtcg tcgacaagct tgaaggaacg accttcgag tcttgagagg attcagcgag 3180
ctggatttcg gccatgaatt ctacgcaccg caggttgcag taaacggtc tgatgcctgg 3240
ctcgtgggct ggatggggct gccgcgcag gatgatcacc caacagttgc acaggaagga 3300
tgggtgcaact gctgactgt gcccgcgaag cttcatttgc gcaaccacgc gatctacaa 3360
gagctccttc tcccagaggg ggagtcgggg gtaatcagat ctgtattagg ttctgaacct 3420
gtccgagtag acatccgagg caatatttcc ctcgagtggg atggtgtccg ttgtctgtg 3480
gatcgtgatg gtgatcgtc cgtagctgag gtaaacctg gcgaattagt gatcgcgac 3540
gataatacag ccattgagat aactgcaggt gatggacagg ttctatcgc ttttcgggc 3600
cttcaaaggt gacactattg agagataagt catataaag ggtcttttgt ggcaattgt 3660
acaaatactt cgcaaaatcc cttgatcgga cacaataaa caggtttaat attgttttagc 3720

4/20

ttttgaacaa acattcatgt ctgaatat	tttcttc ccggttaagg agaaattc	3778
atg gac cat aag gac ctc gcg caa cgc atc ctg cgc gac att ggc ggc		3826
Met Asp His Lys Asp Leu Ala Gln Arg Ile Leu Arg Asp Ile Gly Gly		
1 5 10 15		
gaa gac aac att gtc gcc gcc gca cac tgt gca acg cgt tta cgc ctc		3874
Glu Asp Asn Ile Val Ala Ala Ala His Cys Ala Thr Arg Leu Arg Leu		
20 25 30		
gtg ctc aaa gac acc aag gat gtg gat cgc caa agt ctg gat gat gat		3922
Val Leu Lys Asp Thr Lys Asp Val Asp Arg Gln Ser Leu Asp Asp Asp		
35 40 45		
cca gat ctg aaa ggc acc ttt gaa act ggc ggc atg ttc cag atc atc		3970
Pro Asp Leu Lys Gly Thr Phe Glu Thr Gly Gly Met Phe Gln Ile Ile		
50 55 60		
gtc ggc cca ggc gat gtg gat cat gtt ttc aaa gaa ctc gat gac gca		4018
Val Gly Pro Gly Asp Val Asp His Val Phe Lys Glu Leu Asp Asp Ala		
65 70 75 80		
acc tcc aaa gac atc gct gtg tcc aca gag cag ctc aaa gat gtt gtg		4066
Thr Ser Lys Asp Ile Ala Val Ser Thr Glu Gln Leu Lys Asp Val Val		
85 90 95		
gct aac aac gcc aac tgg ttc agc cgt gct gtg aag gta ttg gcg gac		4114
Ala Asn Asn Ala Asn Trp Phe Ser Arg Ala Val Lys Val Leu Ala Asp		
100 105 110		
att ttc gtc ccg ctg att cca atc ttg gtt ggt ggc ggt ctg ctc atg		4162
Ile Phe Val Pro Leu Ile Pro Ile Leu Val Gly Gly Gly Leu Leu Met		
115 120 125		
gct atc aac aat gtg ttg gtt gcg cag gat ctg ttc ggt ccg caa tca		4210
Ala Ile Asn Asn Val Leu Val Ala Gln Asp Leu Phe Gly Pro Gln Ser		
130 135 140		
ctg gtg gag atg ttc cct cag atc agc ggt gtt gct gag atg atc aac		4258

5/20

Leu Val Glu Met Phe Pro Gln Ile Ser Gly Val Ala Glu Met Ile Asn
 145 150 155 160
 ctg atg gca tct gcg ccg ttc gcg ttc ttg cca gtg ttg gtt ggt ttc 4306
 Leu Met Ala Ser Ala Pro Phe Ala Phe Leu Pro Val Leu Val Gly Phe
 165 170 175
 acc gca acc aag cgt ttc ggt ggc aat gag ttc ctg ggc gcc ggc att 4354
 Thr Ala Thr Lys Arg Phe Gly Gly Asn Glu Phe Leu Gly Ala Gly Ile
 180 185 190
 ggt atg gcg atg gtg ttc cca acc ctg gtt aac ggc tac gac gtg gcc 4402
 Gly Met Ala Met Val Phe Pro Thr Leu Val Asn Gly Tyr Asp Val Ala
 195 200 205
 gcc acc atg acc gcg ggc gaa atg cca atg tgg tcc ctg ttt ggt ttg 4450
 Ala Thr Met Thr Ala Gly Glu Met Pro Met Trp Ser Leu Phe Gly Leu
 210 215 220
 gat gtt gct caa gct ggt tac cag ggc acc gtg ctt cct gtg ctg gtg 4498
 Asp Val Ala Gln Ala Gly Tyr Gln Gly Thr Val Leu Pro Val Leu Val
 225 230 235 240
 gtc tct tgg att ctg gca acg atc gag aag ttc ctg cac aag cga ctc 4546
 Val Ser Trp Ile Leu Ala Thr Ile Glu Lys Phe Leu His Lys Arg Leu
 245 250 255
 atg ggc act gca gac ttc ctg atc acc cca gtg ttg act ctg ctg ctc 4594
 Met Gly Thr Ala Asp Phe Leu Ile Thr Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu
 260 265 270
 acc ggc ttc ctt acg ttc att gct att ggt cca gca atg cgc tgg gtg 4642
 Thr Gly Phe Leu Thr Phe Ile Ala Ile Gly Pro Ala Met Arg Trp Val
 275 280 285
 ggt gac ttg ctg gca cac ggt ctg cag gga ctc tat gat ttc ggt ggt 4690
 Gly Asp Leu Leu Ala His Gly Leu Gln Gly Leu Tyr Asp Phe Gly Gly
 290 295 300

6/20

cca gtc ggc ggt ctg ctt ttc ggt ctg gtc tac tca cca atc gtt atc 4738
 Pro Val Gly Gly Leu Leu Phe Gly Leu Val Tyr Ser Pro Ile Val Ile
 305 310 315 320
 act ggt ctg cac cag tcc ttc ccg cca att gag ctg gag ctg ttc aac 4786
 Thr Gly Leu His Gln Ser Phe Pro Pro Ile Glu Leu Glu Leu Phe Asn
 325 330 335
 cag ggt gga tcc ttc atc ttc gca acc gca tcc atg gcc aat atc gcg 4834
 Gln Gly Gly Ser Phe Ile Phe Ala Thr Ala Ser Met Ala Asn Ile Ala
 340 345 350
 cag ggt gca gca tgt ttg gca gtg ttc ttc cta gcg aag agt gaa aag 4882
 Gln Gly Ala Ala Cys Leu Ala Val Phe Phe Leu Ala Lys Ser Glu Lys
 355 360 365
 ctc aag ggc ctt gca ggt gct tca ggt gtc tcc gct gtt ctt ggt att 4930
 Leu Lys Gly Leu Ala Gly Ala Ser Gly Val Ser Ala Val Leu Gly Ile
 370 375 380
 aca gag cct gcg atc ttc ggt gtg aac ctt cgc ctg cgc tgg ccg ttc 4978
 Thr Glu Pro Ala Ile Phe Gly Val Asn Leu Arg Leu Arg Trp Pro Phe
 385 390 395 400
 tac att ggt atc ggt acc gca gct atc ggt ggc gct ttg att gca ctc 5026
 Tyr Ile Gly Ile Gly Thr Ala Ala Ile Gly Gly Ala Leu Ile Ala Leu
 405 410 415
 ttt gat atc aag gca gtt gcg ttg ggc gct gca ggt ttc ttg ggt gtt 5074
 Phe Asp Ile Lys Ala Val Ala Leu Gly Ala Ala Gly Phe Leu Gly Val
 420 425 430
 gtt tct att gat gct cca gat atg gtc atg ttc ttg gtt tgc gcg gta 5122
 Val Ser Ile Asp Ala Pro Asp Met Val Met Phe Leu Val Cys Ala Val
 435 440 445
 gtt acc ttt gtc atc gca ttc ggc gca gcg att gct tat ggc ctt tac 5170
 Val Thr Phe Val Ile Ala Phe Gly Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Tyr

7/20

450	455	460	
ttg gtt cgc cgc aac ggc agc att gat cca gat gca acc gct gct cca	5218		
Leu Val Arg Arg Asn Gly Ser Ile Asp Pro Asp Ala Thr Ala Ala Pro			
465	470	475	480
gtg cct gca gga acg acc aaa gcc gaa gca gaa gca ccc gca gaa ttt	5266		
Val Pro Ala Gly Thr Thr Lys Ala Glu Ala Glu Ala Pro Ala Glu Phe			
	485	490	495
tca aac gat tcc acc atc atc cag gca cct ttg acc ggt gaa gct atc	5314		
Ser Asn Asp Ser Thr Ile Ile Gln Ala Pro Leu Thr Gly Glu Ala Ile			
	500	505	510
gca ctg agc agc gtc agc gat gcc atg ttt gcc agc gga aag ctt ggc	5362		
Ala Leu Ser Ser Val Ser Asp Ala Met Phe Ala Ser Gly Lys Leu Gly			
	515	520	525
tca ggt gtt gcg atc gtc ccc acc aag ggg cag ctg gtt tca cca gtg	5410		
Ser Gly Val Ala Ile Val Pro Thr Lys Gly Gln Leu Val Ser Pro Val			
	530	535	540
agc gga aag atc gtg gtg gcc ttc cca tct ggt cac gct ttc gca gtc	5458		
Ser Gly Lys Ile Val Val Ala Phe Pro Ser Gly His Ala Phe Ala Val			
545	550	555	560
cgc act aag gct gag gat ggt tcc aat gtg gat atc ttg atg cac att	5506		
Arg Thr Lys Ala Glu Asp Gly Ser Asn Val Asp Ile Leu Met His Ile			
	565	570	575
ggt ttc gac acc gta aac ctc aac ggc acg cac ttt aac ccg ctg aag	5554		
Gly Phe Asp Thr Val Asn Leu Asn Gly Thr His Phe Asn Pro Leu Lys			
	580	585	590
aag cag ggc gat gaa gtc aaa gca ggg gag ctg ctg tgt gaa ttc gat	5602		
Lys Gln Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Glu Leu Leu Cys Glu Phe Asp			
	595	600	605
att gat gcc att aag gct gca ggt tat gag gta acc acg ccg att gtt	5650		

8/20

Ile Asp Ala Ile Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Val Thr Thr Pro Ile Val
 610 615 620
 gtt tgc aat tac aag aaa acc gga cct gta aac act tac ggt ttg ggc 5698
 Val Ser Asn Tyr Lys Lys Thr Gly Pro Val Asn Thr Tyr Gly Leu Gly
 625 630 635 640
 gaa att gaa gcg gga gcc aac ctg ctc aac gtc gca aag aaa gaa gcg 5746
 Glu Ile Glu Ala Gly Ala Asn Leu Leu Asn Val Ala Lys Lys Glu Ala
 645 650 655
 gtg cca gca aca cca taagttgaaa ccttgagtgt tcgcacacag gttagactag 5801
 Val Pro Ala Thr Pro
 660
 gggacgtgac tctacgcac tttgacaccg gtaccggtac gcttcgagat tttaaacctg 5861
 ttcaaccagg tcatgcctcg gtgtacctgt gtggtgccac cccgcaatct tcaccccaca 5921
 ttggacatgt tcgttcagca gtagegtttg atattttgcg ccgctgaa 5969

<210> 2

<211> 661

<212> PRT

<213> Brevibacterium lactofermentum

<400> 2

Met Asp His Lys Asp Leu Ala Gln Arg Ile Leu Arg Asp Ile Gly Gly
 1 5 10 15
 Glu Asp Asn Ile Val Ala Ala Ala His Cys Ala Thr Arg Leu Arg Leu
 20 25 30
 Val Leu Lys Asp Thr Lys Asp Val Asp Arg Gln Ser Leu Asp Asp Asp
 35 40 45
 Pro Asp Leu Lys Gly Thr Phe Glu Thr Gly Gly Met Phe Gln Ile Ile
 50 55 60

9/20

Val Gly Pro Gly Asp	Val Asp His Val Phe Lys Glu Leu Asp Asp Ala
65	80
Thr Ser Lys Asp Ile Ala Val Ser Thr Glu Gln Leu Lys Asp Val Val	
85	95
Ala Asn Asn Ala Asn Trp Phe Ser Arg Ala Val Lys Val Leu Ala Asp	
100	110
Ile Phe Val Pro Leu Ile Pro Ile Leu Val Gly Gly Gly Leu Leu Met	
115	125
Ala Ile Asn Asn Val Leu Val Ala Gln Asp Leu Phe Gly Pro Gln Ser	
130	140
Leu Val Glu Met Phe Pro Gln Ile Ser Gly Val Ala Glu Met Ile Asn	
145	160
Leu Met Ala Ser Ala Pro Phe Ala Phe Leu Pro Val Leu Val Gly Phe	
165	175
Thr Ala Thr Lys Arg Phe Gly Gly Asn Glu Phe Leu Gly Ala Gly Ile	
180	190
Gly Met Ala Met Val Phe Pro Thr Leu Val Asn Gly Tyr Asp Val Ala	
195	205
Ala Thr Met Thr Ala Gly Glu Met Pro Met Trp Ser Leu Phe Gly Leu	
210	220
Asp Val Ala Gln Ala Gly Tyr Gln Gly Thr Val Leu Pro Val Leu Val	
225	240
Val Ser Trp Ile Leu Ala Thr Ile Glu Lys Phe Leu His Lys Arg Leu	
245	255
Met Gly Thr Ala Asp Phe Leu Ile Thr Pro Val Leu Thr Leu Leu Leu	
260	270
Thr Gly Phe Leu Thr Phe Ile Ala Ile Gly Pro Ala Met Arg Trp Val	
275	285
Gly Asp Leu Leu Ala His Gly Leu Gln Gly Leu Tyr Asp Phe Gly Gly	

10/20

290	295	300	
Pro Val Gly Gly Leu Leu Phe Gly Leu Val Tyr Ser Pro Ile Val Ile			
305	310	315	320
Thr Gly Leu His Gln Ser Phe Pro Pro Ile Glu Leu Glu Leu Phe Asn			
	325	330	335
Gln Gly Gly Ser Phe Ile Phe Ala Thr Ala Ser Met Ala Asn Ile Ala			
	340	345	350
Gln Gly Ala Ala Cys Leu Ala Val Phe Phe Leu Ala Lys Ser Glu Lys			
	355	360	365
Leu Lys Gly Leu Ala Gly Ala Ser Gly Val Ser Ala Val Leu Gly Ile			
	370	375	380
Thr Glu Pro Ala Ile Phe Gly Val Asn Leu Arg Leu Arg Trp Pro Phe			
385	390	395	400
Tyr Ile Gly Ile Gly Thr Ala Ala Ile Gly Gly Ala Leu Ile Ala Leu			
	405	410	415
Phe Asp Ile Lys Ala Val Ala Leu Gly Ala Ala Gly Phe Leu Gly Val			
	420	425	430
Val Ser Ile Asp Ala Pro Asp Met Val Met Phe Leu Val Cys Ala Val			
	435	440	445
Val Thr Phe Val Ile Ala Phe Gly Ala Ala Ile Ala Tyr Gly Leu Tyr			
	450	455	460
Leu Val Arg Arg Asn Gly Ser Ile Asp Pro Asp Ala Thr Ala Ala Pro			
465	470	475	480
Val Pro Ala Gly Thr Thr Lys Ala Glu Ala Glu Ala Pro Ala Glu Phe			
	485	490	495
Ser Asn Asp Ser Thr Ile Ile Gln Ala Pro Leu Thr Gly Glu Ala Ile			
	500	505	510
Ala Leu Ser Ser Val Ser Asp Ala Met Phe Ala Ser Gly Lys Leu Gly			
	515	520	525

11/20

Ser Gly Val Ala Ile Val Pro Thr Lys Gly Gln Leu Val Ser Pro Val

530

535

540

Ser Gly Lys Ile Val Val Ala Phe Pro Ser Gly His Ala Phe Ala Val

545

550

555

560

Arg Thr Lys Ala Glu Asp Gly Ser Asn Val Asp Ile Leu Met His Ile

565

570

575

Gly Phe Asp Thr Val Asn Leu Asn Gly Thr His Phe Asn Pro Leu Lys

580

585

590

Lys Gln Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Glu Leu Leu Cys Glu Phe Asp

595

600

605

Ile Asp Ala Ile Lys Ala Ala Gly Tyr Glu Val Thr Thr Pro Ile Val

610

615

620

Val Ser Asn Tyr Lys Lys Thr Gly Pro Val Asn Thr Tyr Gly Leu Gly

625

630

635

640

Glu Ile Glu Ala Gly Ala Asn Leu Leu Asn Val Ala Lys Lys Glu Ala

645

650

655

Val Pro Ala Thr Pro

660

<210> 3

<211> 44

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Sau3AI cassette

<220>

<221> misc_feature

12/20

<222> (44)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-ctag-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 3

gtacatattg tcgttagaac gcgtaatacg actcactata ggga

44

<210> 4

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: EcoRI cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-ttaa-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 4

gtacatattg tcgttagaac gcgtaatacg actcactata gggagag

47

<210> 5

<211> 46

<212> DNA

13/20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: HindIII cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (46)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-tcga-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 5

gtacatattg tcgtagaac gcgtaatacg actcactata gggaga

46

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: PstI cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (48)..(51)

<223> complementary strand does not exist

<400> 6

gtacatattg tcgtagaac gcgtaatacg actcactata gggagactgc a

51

14/20

<210> 7

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Sall cassette

<220>

<221> misc_feature

<222> (47)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-agct-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 7

gtacatattg tcgttagaac gcgtaatag actcactata gggagag

47

<210> 8

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: XbaI cassette

<220>

<221> misc_feature

15/20

<222> (47)

<223> complementary strand extends a single strand having
a sequence of 3'-gatc-5' at this position in the
direction of 5' from 3'

<400> 8

gtacatatg tcgttagaac gcgtaatacg actcactata gggagat

47

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 9

cgtcttgcca ggattcagcg agctg

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 10

agctggattt cggccatgaa ttcta

25

16/20

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 11

gatctgttcg gtccgcaatc act

23

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 12

cactggtgga gatgttcct cagat

25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

17/20

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 13

catcttcgca accgcatcca tggcc

25

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 14

cgcgccagggt gcagcatgtt tggc

24

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 15

gggccttgca ggtgcttcag gtgtc

25

<210> 16

<211> 25

<212> DNA

18/20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 16

ccgctgttct tggattaca gagcc

25

<210> 17

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 17

gcagcgtcag cgatgccatg tttgc

25

<210> 18

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 18

gcttggtca ggtgttgca tcgtc

25

19/20

<210> 19

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: cassette
primer 1

<400> 19

gtacatattg tcgttagaac gcggtataac gactca

36

<210> 20

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: cassette
primer 2

<400> 20

cgttagaacg cgtaatacga ctcactatag ggaga

35

<210> 21

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20/20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: primer for PCR

<400> 21

cgctactgct gaacgaacat gtcc

24

12T
Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference B644MSOP1027	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP00/04348	International filing date (day/month/year) 30 June 2000 (30.06.00)	Priority date (day/month/year) 02 July 1999 (02.07.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/54, 9/12		
Applicant AJINOMOTO CO., INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 02 February 2001 (02.02.01)	Date of completion of this report 11 April 2001 (11.04.2001)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/04348

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☒ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☒ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP 00/04348

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-3	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

[Claim 1 to 3]

The invention disclosed in Claims 1 to 3 involves an inventive step in relation to Documents 1 to 8 cited in the international search report. Documents 1 to 8 do not disclose an amino acid sequence coded by "SEQ ID NO: 2" or a nucleotide sequence having high homology with "the nucleotide sequence comprising bases 3778-5761 of the nucleotide sequence presented in SEQ ID NO: 1". Moreover, the fact that said amino acid sequence and said nucleotide sequence have sucrose-binding activity could not be easily conceived of by a person skilled in the art in the light of the disclosures made in Documents 1 to 3.